

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KARLA VERÓNICA ALVARADO HERNÁNDEZ

**ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM
FOLHAS DO MAMOEIRO 'GOLDEN' INFECTADAS COM
PMeV, DETECTADAS POR MEIO DA FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA *a***

VITÓRIA, ES

2017

KARLA VERÓNICA ALVARADO HERNÁNDEZ

**ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM
FOLHAS DO MAMOEIRO 'GOLDEN' INFECTADAS COM
PMeV, DETECTADAS POR MEIO DA FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA *a***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Diolina Moura Silva

VITÓRIA, ES

2017

KARLA VERÓNICA ALVARADO HERNÁNDEZ

**ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA EM
FOLHAS DO MAMOEIRO 'GOLDEN' INFECTADAS COM
PMeV, DETECTADAS POR MEIO DA FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA *a***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Agronegócio, da Universidade Federal do Espírito Santo, comorequisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 13 de julho de 2017.

Prof^a. Dr^a. Diolina Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Andrea Bittencourt Moura
Universidade Federal de Pelotas
Membro Externo

Prof. Dr. José Aires Ventura
Universidade Federal do Espírito Santo/INCAPER
Membro Interno

Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro Interno

VITÓRIA, ES
2017

*“Tenho que ser cego para sentir teu amor porque aqueles que
veem não te sentem”*

Dedicada á Luz mais sublime que transforma a vida

Ao único digno de receber toda a honra e gloria!!!

“O grande EU Sou”

AGRADECIMENTOS

A Deus por me iluminar nesta caminhada conhecendo outras latitudes e pessoas que enriqueceram a minha vida.

A Universidade Federal do Espírito Santo e o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade para desenvolver esse trabalho.

A TecNM (Tecnológico Nacional de México) e ao Director do Instituto Tecnológico de Comitán Pedro Ancheyta Bringas pela formação acadêmica, apoio, divulgação e acompanhamento.

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por financiar a minha bolsa de estudos.

A EMBAMEX (EMBAJADA DO MÉXICO EM BRASIL) pelo apoio, seguimento, acompanhamento e monitoramento.

A Cande e Lucio meus queridos pais, pelo amor confiança e direção, a meus irmãos; José pelos conselhos e apoio, a David e Miguel por seu amor.

De forma especial a Prof^a. Dra. Diolina Moura Silva, pela orientação, sugestões, paciência e por acreditar em mim, muito obrigada por tudo.

Aos Professores que constituíram a Banca Examinadora obrigada pelas contribuições e por dedicar seu tempo para avaliar o meu trabalho.

Ao Núcleo de Estudos da Fotossíntese, especialmente ao Leonardo, Thais, Juliana, Amanda e os meninos que formam esta equipe de trabalho do NEF. Obrigada pelo apoio, trabalho, contribuições, sugestões e bom ânimo. Em vocês achei uma segunda casa algo muito além de um laboratório de pesquisa.

Ao laboratório de Biotecnologia da área de Agronegócio, da Universidade Federal do Espírito Santo, especialmente ao pessoal diretivo especialmente a Prof.^a Patrícia Machado, a Leidy Johana pelo apoio e amizade, Tatiana Sa Antunes pelo apoio com as análises de PCR.

A minha querida amiga Edeleusa Cupertino pelo apoio, confiança, ajuda e pelo amor com que foi acolhida na sua casa muito obrigada sempre.

A todos os meus amigos e amigas, aos colegas e compatriotas da turma de 2017-Brasil-México.

RESUMO

O mamão, *Carica papaya* L., é uma das frutas mais consumidas no mundo devido as suas características nutricionais, farmacêuticas e uso na indústria alimentícia e cosmética. No Brasil, segundo produtor de mamão no mundo, a produção vem sendo afetada severamente pela doença da meleira, provocada pelo complexo *Papaya meleira virus* (PMeV e PMeV2). Com o objetivo de analisar as alterações na atividade fotossintética em folhas de mamoeiro 'Golden', com infecção do PMeV e diferentes cargas virais do PMeV2, realizou-se um experimento onde foram avaliados três grupos de plantas de *Carica papaya* cv. Golden: Controle, sem inocular; inoculadas com tampão fosfato de sódio (Tratamento = ↓[PMeV2]) e inoculadas com tampão fosfato de sódio e látex colhido de plantas com sintomas da meleira (Tratamento = ↑[PMeV2]). A técnica da fluorescência da clorofila *a* foi usada como ferramenta de avaliação. Houve um aumento significativo na produção quântica de conversão de energia fotoquímica no fotossistema II (Y (II)) e um aumento do rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica regulada (Y (NPQ)) nas plantas infectadas. Simultaneamente, curvas OJIP de fluorescência, evidenciaram maior eficiência na redução dos aceptores primários (Quinona A) e secundários (Quinona B) de elétrons no fotossistema II e maior eficiência de redução do "pool" de plastoquinonas e, conseqüente, maior eficiência na redução dos aceptores de elétrons do complexo Cit_{b6f}. O diagnóstico da meleira nas plantas, usando a técnica de RT-PCR, confirmou a presença de dois vírus PMeV e PMeV2. Foi verificado maior índice de desempenho fotoquímico (PI_{total}) nas plantas com maior carga viral a partir do 35º dia após a inoculação (DAI) e, aos 49 DAI, observou-se aumento na atividade redutora do fotossistema I e no PI_{total} nas plantas com maior carga viral e valores intermediários nas plantas com menor carga viral. Estes resultados sugerem uma resposta de defesa do mamoeiro cv. Golden à infecção e comprovam a presença dos dois vírus, PMeV e PMeV2. Portanto, esta técnica mostrou-se uma ferramenta com grande potencial como um método simples e rápido para estudar a interação planta x patógeno, bem como os mecanismos de infecção de vírus em plantas podendo ser também usado para detecção das alterações na atividade fotossintética no mamoeiro infectado pelo complexo PMeV e PMeV2.

Palavras-chave: *Carica papaya*, *Papaya meleira virus*, Rendimento quântico.

ABSTRACT

Papaya (*Carica papaya* L.) is one of the most consumed fruits in the world due to its nutritional, pharmaceutical and use in the food and cosmetic industry. In Brazil, the second producer of papaya in the world, the production has been severely affected by meleira, disease which is caused by the complex of *Papaya meleira virus* (PMeV and PMeV2). In order to analyze the changes in photosynthetic activity in 'Golden' papaya leaves infected and not infected by PMeV, the experiment was carried out in which three groups of plants were evaluated: Control, without inoculation; Inoculated with sodium phosphate buffer (Treatment = \downarrow [PMeV2]) and inoculated with sodium phosphate buffer and latex harvested from plants with meleira symptoms (Treatment = \uparrow [PMeV2]). The chlorophyll *a* fluorescence technique was used as a tool. There was a significant increase in quantum photochemical energy conversion in photosystem II (Y (II)) and an increase in the quantum yield of the regulated non-photochemical energy loss (Y (NPQ)) in the inoculated plants. At the same time, transient fluorescence curves showed greater efficiency in the reduction of the primary (Quinone A) and secondary (Quinone B) acceptors of electrons in photosystem II and greater efficiency of reduction of the plastoquinone pool and, consequently, greater efficiency in the reduction of acceptors of the Cit_{b6f} complex. The presence of two PMeV viruses and PMeV2 confirmed the presence of two PMeV viruses. A higher photochemical performance index (PI_{total}) was observed in the plants with the highest viral load from the 35th day after inoculation (DAI), and at 49 DAI, an increase in the reduction activity of photosystem I and PI_{total} was observed in plants with higher viral load and intermediate values in plants with lower viral load. These results suggest a defensive response of papaya cv. Golden to infection and confirm the presence of the two viruses, PMeV and PMeV2. Therefore, this technique proved to be a tool with great potential as a simple and fast method to study the interaction plant x pathogen and as the mechanisms of virus infection in plants and could also be used to detect the changes in photosynthetic activity in papaya infected with PMeV and PMeV2.

Key words: *Carica papaya*, *Papaya meleira virus*, Quantum yield

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

| | |
|----------------|------------------------------------|
| CEO | Complexo de Evolução do Oxigenio |
| Chl | Clorofila |
| CR | Centros de Reação |
| DAI | Dias Após a Inoculação |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FSI | Fotossistema I |
| FSII | Fotossistema II |
| PAM | Pulso de Amplitude Modulada |
| PMeV | <i>Papaya meleira</i> virus |
| ↓[PMeV2] | Menor carga do virus PMeV2 |
| ↑[PMeV2] | Maior carga do virus PMeV2 |
| Q _A | Quinona A |
| RFA | Radiação Fotossinteticamente Ativa |
| RNA | Ácido Ribonucleico |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 Cultura do mamoeiro | 11 |
| 2.2 A meleira do mamoeiro | 12 |
| 2.3 Alterações fotossintéticas causadas pelo estresse biótico | 13 |
| 3. OBJETIVO GERAL | 16 |
| 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 16 |
| 5. MATERIAL E MÉTODOS | 17 |
| 5.1 Material vegetal e condições de cultivo | 17 |
| 5.2 Inoculação de plantas do mamoeiro | 17 |
| 5.3 Avaliação da Eficiência Fotoquímica | 18 |
| 5.4 Diagnóstico molecular dos virus associados à meleira por RT-PCR | 20 |
| 5.5 Delineamento experimental e Análise estatística | 21 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 21 |
| 7. CONCLUSÕES | 33 |
| REFERÊNCIAS | 34 |
| ANEXOS | 38 |

1. INTRODUÇÃO

O mamão é um fruto bastante apreciado pelo consumidor, porém a cultura do mamoeiro apresenta uma série de doenças que afetam sua comercialização. Dentre as doenças de considerável impacto econômico, a meleira, causada pelo complexo do *Papaya meleira virus* (PMeV e PMeV2), tem sido bastante estudada, entretanto o entendimento da fisiologia da planta infectada ainda continua exigindo maiores esclarecimentos.

Essa doença é problemática pela dificuldade de identificar precocemente sua presença na planta, uma vez que os sintomas ocorrem aproximadamente 6 meses após a floração, nos frutos. O retardo no diagnóstico leva a perdas econômicas na produção e comercialização do mamoeiro uma vez que diagnosticado os sintomas, a erradicação das plantas doentes é a estratégia atual para controlar a meleira. Apesar do aprimoramento de técnicas em se identificar precocemente o PMeV em tecidos de mamoeiro como o uso de RT-PCR há uma carência de informações sobre os aspectos chave na interação planta x vírus, o que impossibilita a implementação de estratégias mais efetivas de controle da meleira.

A característica inicial da meleira no mamoeiro é o aparecimento de lesões necróticas nas pontas das folhas jovens e pecíolos e exsudação espontânea de látex aquoso e coloração escura com aspecto melado na casca do fruto (ANEXO A). O PMeV ocasiona um desbalanço osmótico nos laticíferos infectados e um aumento na atividade de enzimas relacionadas as espécies reativas de oxigênio nas folhas apontando para uma resposta sistemática em toda a planta. No entanto, não se sabe qual o mecanismo de resposta ao estresse relacionado a resistência à meleira durante o pré-florescimento do mamoeiro.

Proteínas relacionadas à cadeia transportadora de elétrons da fotossíntese, como por exemplo, a proteína V do fotossistema II e a proteína H do fotossistema I foram observadas no estágio de pré-florescimento de mamoeiro infectado com o complexo PMeV e PMeV2. A atividade fotossintética aumentada poderia ter efeito na indução da imunidade da planta, o que poderia contribuir para aumentar a resistência ao PMeV e PMeV2 no estágio de pré-florescimento do desenvolvimento da planta (SOARES et al, 2017). Estes estudos consideram a fotossíntese como um mecanismo de

resistência/tolerância ao desenvolvimento dos sintomas da meleira no pré-florescimento do mamoeiro.

De acordo com a hipótese de que proteínas relacionadas a fotossíntese apresentam abundância significativa em mamoeiros infectados com PMeVe PMeV2 sugere-se que uma alteração na atividade fotossintética durante o estágio pré-florescimento da planta poderia estar relacionado com a indução da resistência da planta ao vírus da meleira.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do mamoeiro

O mamão é uma das frutas mais produzidas no mundo, sendo aproximadamente 12,7 milhões de toneladas colhidas no ano de 2016. Os principais produtores de mamão são Índia com 5.639.300, Brasil 1.603.351, Nigéria 850.000, Indonésia 840.121 e México 836.370, totalizando aproximadamente 9.769.142 de tonelada por ano. O Brasil é responsável por produzir 12.62 % da oferta mundial (FAOSTAT, 2017). As principais empresas produtoras e exportadoras de mamão do Brasil encontram-se na região norte do Estado do Espírito Santo e Bahia e exportam para países europeus e Estados Unidos.

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é a única espécie representante do gênero *Carica*, amplamente distribuído pela América tropical e que apresenta frutos de interesse comercial (BADILLO, 2000). As características mais importantes desta cultura são a sua alta produtividade, desenvolvimento rápido, produção contínua e propagação por semente (MANICA et al., 2006). No entanto, a cultura é suscetível a diversos patógenos. A susceptibilidade das plantas às viroses resulta no menor rendimento da cultura e em frutos de baixa qualidade (VENTURA et al., 2004), responsáveis muitas vezes por perdas econômicas significativas na produção, comercialização e exportação.

2.2 A meleira do mamoeiro

Dentre as doenças de importância econômica de *Carica papaya* destaca-se a meleira do mamoeiro, causada pelo vírus *Papaya meleira virus*(PMeV). A meleira é causada pelo complexo viral PMeV e PMeV2, dois vírus que, juntos, provocam os sintomas característicos da doença (ANTUNES et al., 2016).

Uma das características da meleira é que ela acomete a planta na transição do estágio vegetativo para reprodutivo, que ocorre aproximadamente entre 4 e 6 meses após a germinação, quando acontece a floração. Os sintomas ocorrem após este estágio (VENTURA et al., 2003; ZAMBOLIM et al., 2003). Dentre os sintomas da meleira (ANEXO A) verifica-se a exsudação espontânea de látex fluido e translúcido a partir do fruto, que ao oxidar forma manchas de coloração escura que conferem um aspecto “melado” na superfície do fruto tornando os frutos impróprios a comercialização. As alterações morfológicas do látex, derivadas da presença do vírus, também causam pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens e pecíolo. Em estágio avançado da doença, são observadas áreas irregulares verde-clara na superfície de frutos infectados (VENTURA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2009).

Os primeiros relatos da doença ocorreram no início da década de 80, no Espírito Santo e Bahia (LIMA et al., 2001). Relatos dessa doença também ocorrem em Pernambuco, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (DALTRO et al., 2014). A presença do vírus também foi relatada no México, embora os sintomas da doença sejam semelhantes aos descritos no Brasil, mamoeiros da cultivar Maradol apresentam uma exsudação de látex mais severa no fruto, com ausência de necrose nas pontas das folhas (PEREZ-BRITO et al., 2012).

Atualmente, a estratégia utilizada para controlar a meleira do mamoeiro é a erradicação das plantas doentes (*roguing*). Geralmente, o vírus infecta cerca de 20% das plantas durante o ciclo produtivo, porém, em algumas plantações, nas quais o “roguing” não foi realizado, têm-se registrado uma incidência de até 100% na fase de colheita em plantas com apenas 12 a 15 meses de plantio. Entretanto, os sintomas ocorrem somente após a floração. Portanto, plantas infectadas, porém assintomáticas são também capazes de transmitir o patógeno (VENTURA et al., 2004).

O primeiro método molecular que permitiu a detecção precoce do PMeV foi realizado através da extração do dsRNA viral a partir do látex das plantas sintomáticas para a meleira (RODRIGUES et al., 2005). Também foram descritos os procedimentos para a coleta e armazenamento de amostras de látex no campo visando sensibilidade máxima no diagnóstico (RODRIGUES et al., 2009). Mais recentemente, foram propostos dois novos métodos de diagnóstico utilizando-se RT-PCR e RT-PCR quantitativo (qRT-PCR, do inglês *quantitative RT-PCR*), expandindo-se o diagnóstico do PMeV para tecidos de mamoeiros, tornando-o ainda mais sensível (ABREU et al., 2012). Essa sensibilidade permitiu identificar diversas plantas no campo que passaram pelo processo de florescimento, assintomáticas para a meleira, porém infectadas com o PMeV. No entanto, mesmo com o aprimoramento das ferramentas de diagnóstico do PMeV, os fatores envolvidos no aparecimento dos sintomas dessa doença são desconhecidos e há uma carência de informações sobre os aspectos chave na interação planta x vírus.

O estudo da interação planta-patógeno pode fornecer possíveis respostas envolvidas na compreensão de um patossistema, contribuindo para a compreensão dos eventos relacionados a doenças causadas por vírus RNA em plantas (RAO; CHATURVEDI; GARMANN, 2014). Sabe-se que a infecção viral é um processo altamente dinâmico no qual células vegetais infectadas são transformadas em grandes produtos de consumidores virais provocando a realocação de fotoassimilados, aumentando a respiração e diminuindo a atividade fotossintética do vegetal. Tais mudanças metabólicas contribuem para ativar mecanismos de defesa das plantas (LLAVE, 2016).

2.3 Alterações fotossintéticas causadas por estresse biótico

As plantas são continuamente estudadas por estarem expostas a condições de estresse tanto biótico como abiótico. Além de estresses abióticos, em condições naturais, as plantas enfrentam a ameaça de infecção por patógenos, incluindo bactérias, fungos, vírus e nematoides (ATKINSON e URWIN, 2012).

O habitat de pragas e patógenos pode ser influenciado pelas mudanças climáticas.

Por exemplo, o aumento da temperatura facilita a disseminação de patógenos. Além disso, muitas condições de estresse abiótico parecem enfraquecer os mecanismos de defesa das plantas e aumentar a sua susceptibilidade à infecção por patógenos (LUCK et al., 2011).

Para examinar a resposta do metabolismo primário ao ataque biótico, já foram discutidos a partir de vias metabólicas e sinalizadoras listas de genes da etapa fotoquímica e da fixação de carbono fotossintético, do metabolismo da sacarose e do amido e da biossíntese de flavonoides. Ao mesmo tempo, para observar alterações em outros sistemas de sinalização e caminhos de biossíntese, também já foram realizadas listas de genes de diferentes processos, tais como, fotorrespiração, ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e resposta de defesa relacionada ao etileno (ET) e do sistema de oxigênio reativo, ROS (BILGIN et al., 2010).

Os cloroplastos são um alvo principal para vírus, porque esta organela sofre enorme dano estrutural e funcional durante a infecção viral. A relação de proteínas do cloroplasto na defesa antiviral pode causar comprometimento e alterar a eficiência fotossintética. Este fato foi evidenciado em plantas de tabaco infectada com TMV (*Tobacco mosaic virus*). Nestas plantas ocorre uma resposta de hipersensibilidade induzida por morte celular programada (BHATTACHARYYA et al., 2017). Em ameixeiras os danos pela infecção com o PPV (*Plum poxvirus*) afetam especialmente o metabolismo do cloroplasto, relacionado com o fotossistema II (FSII), causando, principalmente, acúmulo de EROs (DÍAZ-VIVANCOS et al., 2008).

Na etapa fotoquímica da fotossíntese o Complexo de Evolução de Oxigênio (CEO) quebra a molécula de água liberando prótons (H^+) e elétrons (e^-). O elétron resultante irá reduzir a molécula de clorofila *a* (P_{680}^+) do FSII. O elétron da clorofila *a* (P_{680}) é transferido para transportadores intermediários tais como feofitina (PHE), Quinona A (Q_A), Quinona B (Q_B), plastoquinonas (PQ), e, finalmente, ferredoxina NADP⁺ redutase (FNR) que transfere um elétron de cada uma das duas moléculas de ferredoxina para um terminal aceitador de dois elétrons NADPH. CEO é, portanto, um dos complexos protéicos mais vulneráveis em plantas e extremamente suscetível a condições de estresse biótico e abiótico (BHATTACHARYYA et al., 2015).

Vários estudos evidenciam que cultivares de batata têm resistência a PVY (*Potato*

virus Y). Numa estirpe particularmente agressiva, PVYNTN, foi estudada a dinâmica de eventos primários em processos relacionados com o metabolismo durante a infecção. Neste estudo foram relacionados genes na fotossíntese antes da detecção da multiplicação viral (STARE et al., 2015).

Recentemente, o desenvolvimento de técnicas de imagem, como a fluorescência modulada da clorofila (Chl-F) e a fluorescência por imagem têm facilitado uma análise funcional da fotossíntese por estresse biótico. Imagens de fluorescência da clorofila tem sido aplicada em muitos estudos para detectar fotoinibição (GUIDI; DEGL'INNOCENTI, 2008).

A relação inversa entre fluorescência e atividade fotossintética foi primeiramente descrita por Kautsky (1941), que observou que amostras de tecido fotossintético, após um período de adaptação ao escuro, apresentam modificações características na intensidade da fluorescência da clorofila *a* quando iluminadas. As mudanças chamadas de indução da fluorescência ou “efeito Kautsky” compreendem duas etapas: Uma rápida que ocorre a partir do primeiro segundo de emissão de luz e outra lenta que ocorre a partir de um segundo até a estabilização da fluorescência com cerca de 3 minutos de duração, alcançando um estado de equilíbrio. Paralelamente a fluorescência segue caminhos alternativos de desexcitação que são principalmente fotoquímicas e dissipação na forma de calor (TRISSEL; GAO; WULF, 1993; STIRBET; GOVINDJEE, 2011).

Fisiologicamente a emissão de fluorescência rápida é explicada como consequência da redução dos aceptores de elétrons, exemplificado no esquema “Z” (Anexo B). Uma vez que o fotossistema II (FSII) absorve luz e Q_A recebe um elétron, esteceptor não está mais apto para receber outro elétron até que passe para o carreador de elétrons subsequente, quinona B (Q_B). Durante este período, o centro de reação está “fechado” (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

Diversos parâmetros podem ser extraídos do aumento da fluorescência da clorofila polifásica OJIP. O teste JIP foi proposto para análise da origem polifásica OJIP sendo utilizado no diagnóstico dos estados fisiológicos do estresse da planta devido à sua característica não destrutiva, precisa e rápida (STRASSER, 2004). O rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII) é demonstrado como F_v/F_m , onde a

fluorescência variável (F_v) é a diferença entre a fluorescência máxima (F_m) e a fluorescência mínima (F_0) de folhas adaptadas ao escuro (KITAJIMA e BUTLER, 1975).

Estudos recentes têm apresentado os parâmetros $Y(NO)$, $Y(II)$ e $Y(NPQ)$ para monitorar as mudanças causadas por microorganismos patogênicos. Segundo MIOTTO-VILANOVA et al. (2016) houve decréscimo na energia convertida fotoquimicamente no FSII [$Y(II)$], aumento na fração de energia passivamente dissipada em forma de calor e fluorescência [$Y(NO)$] em mudas de videira inoculadas com o fungo *Botrytis cinerea* que não apresentavam a bactéria *Burkholderia phytofirmans* PsJ.

Sendo assim, acredita-se que as plantas do mamoeiro 'Golden', infectadas pelo PmeV e PMeV2, apresentam alterações na atividade fotossintética e que podem ser detectadas pela fluorescência da clorofila *a*. Adicionalmente, a fluorescência modulada por imagem pode ser uma ferramenta que forneça parâmetros chave na informação das mudanças que acontecem no aparato fotossintético causadas pelos vírus da meleira.

3. OBJETIVO GERAL

Analisar as alterações na atividade fotossintética em folhas de mamoeiro 'Golden' infectadas e não infectadas pelo *Papaya meleira* vírus (PMeV e PMeV2), usando a fluorescência da clorofila *a*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do complexo PMeV e PMeV2 sobre a atividade fotoquímica de folhas mamoeiro 'Golden' usando a fluorescência modulada e a fluorescência transiente da clorofila *a* como ferramentas;

- Analisar as alterações nos parâmetros do Teste JIP provocados pela presença do vírus da meleira (PMeV e PMeV2) nas folhas;
- Diagnosticar a presença do vírus da meleira (PMeV) nas folhas do mamoeiro usando a técnica de RT-PCR.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material vegetal e condições de cultivo

Sementes do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden foram colocadas para germinar em sacolas plásticas contendo terra, areia e turfa (2:3:1) e mantidas em casa de vegetação do Laboratório de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. As mudas com cerca de 60 dias após a germinação foram selecionadas para o experimento. O experimento foi conduzido no período de julho a dezembro de 2016, em condições de casa de vegetação (Anexo C). No interior da casa de vegetação a temperatura foi de $25,0 \pm 2,0$ °C, radiação fotossinteticamente ativa (RFA) de $350 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e umidade relativa de 85% no sistema de irrigação por aspersão.

5.2 Inoculação de plantas do mamoeiro

Plantas de mamoeiro naturalmente infectadas em plantações comerciais do município de Sooretama/ES, com sintomas típicos de meleira, foram utilizadas para a coleta das amostras do látex. O látex foi extraído usando uma lâmina de bisturi esterilizado. Após a coleta, imediatamente o líquido resultante da injúria mecânica foi diluído em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 (1:1, v/v) seguindo metodologia de Abreu et al. (2015).

Dois meses após a germinação, um grupo de plantas (n=5) foram inoculadas no ápice do caule com 20 μL de uma suspensão (1:1, v/v) de látex coletado de frutos com meleira tamponado em fosfato de sódio 50 mM, pH 7.0 (Tratamento = \uparrow [PMeV2]), outro grupo de plantas (n=5) foram injetados 20 μL do tampão fosfato (Tratamento = \downarrow [PMeV2]). O Controle foi designado como sendo um grupo de plantas (n=5)

mantidas intactas, sem injeção de nenhuma solução e que, após a diagnose realizada com TR-PCR, comprovou-se conter somente o vírus PMeV. Todas as plantas foram mantidas em condições de casa de vegetação durante toda a etapa experimental.

5.3 Avaliação da Eficiência Fotoquímica

Foram utilizadas como características fotossintéticas a quantificação da fluorescência transiente e modulada da clorofila *a* e o índice de clorofila nas folhas.

Visando avaliar a heterogeneidade espacial e temporal da eficiência fotoquímica em resposta aos tratamentos (Controle, \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2]), em cada planta, quatro discos de 5 mm de diâmetro (extraídos do limbo foliar, próximo da nervura central) foram coletados tomando-se o cuidado de considerar a parte superior do limbo foliar, dispensando-se a nervura central e as nervuras secundárias. Os discos foram cuidadosamente acondicionados em envelopes de papel alumínio, e, em seguida, em caixa de isopor com gelo e levadas imediatamente para o laboratório onde foram feitas as medidas. As folhas utilizadas para as avaliações foram as mesmas utilizadas para as avaliações da fluorescência transiente da clorofila *a*.

Os valores dos parâmetros da fluorescência modulada da clorofila *a* e respectivas imagens foram obtidos utilizando-se um fluorômetro portátil de pulso modulado, versão MINI (Heinz Walz, Effeltrich, Germany), desenvolvido para o estudo da heterogeneidade bidimensional da atividade fotossintética (Anexo D). Foi aplicado o método de pulsos saturantes, permitindo determinar o rendimento quântico da conversão de energia nos centros de reação do Fotossistema II (FSII), que pode ser afetado por vários fatores intrínsecos e ambientais. Uma câmara digital (CCD IMAG-K) com resolução de 640 × 480 pixels foi utilizada e as imagens da fluorescência da clorofila captadas em função do tempo, fontes de luz e irradiâncias. Os valores de pixel das imagens foram exibidos com a ajuda de uma escala de cores falsa, variando do preto (0,000) até ao vermelho, e passando pelo amarelo, verde, azul e rosa (terminando no 1,000). Após adaptação dos discos foliares ao escuro, durante 30 min, foi aplicado um pulso de luz modulada a 1 Hz e de fraca intensidade (0,1 mmol quanta $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), o que permitiu obter imagens da fluorescência basal (F_0). As imagens da

fluorescência máxima (F_M) foram obtidas pela aplicação de um pulso de luz saturante ($10.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ RFA) modulada a 10 Hz. A eficiência quântica máxima do FSII (F_V/F_M) foi calculada com base nos valores de F_0 e F_M : $F_V/F_M = F_M - F_0/F_M$. Seguidamente, foi ligada a iluminação actínica ($249 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e, durante 5 min, a cada 20 s de intervalo foram aplicados pulsos saturantes para a determinação da fluorescência máxima à luz (F_M') e da fluorescência da clorofila no estado estacionário (F_s). Para cada intervalo, foram registados as imagens e os valores dos vários parâmetros da fluorescência da clorofila. No estado adaptado à luz (estado estacionário), o rendimento quântico do FSII, ϕPSII , foi calculado de acordo com Genty et al. (1989) pela seguinte fórmula: $(F_M' - F_s)/F_M'$. Os rendimentos quânticos da energia dissipada no FSII, de um modo regulado (ϕNPQ) e de um modo não regulado (ϕNO), foram calculados de acordo com Kramer et al. (2004) pelas equações $\phi\text{NPQ} = 1 - \phi\text{PSII} - 1/(\text{NPQ} + 1 + q_L(F_M/F_0 - 1))$ e $\phi\text{NO} = 1/((\text{NPQ} + 1 + q_L)(F_M/F_0 - 1))$.

Os teores de clorofila foram quantificados nas mesmas folhas onde a fluorescência da clorofila *a* foi estimada, usando um clorofilômetro portátil Mod. CL-01 (Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn Norfolk, UK). Este equipamento emite luz na faixa do vermelho (650 nm), comprimento de onda compreendido entre as faixas de absorção das clorofilas *a* e *b* (663 e 645, respectivamente). A transmitância destas duas intensidades de luz é detectada e convertida em sinas digitais. A diferença entre elas é lida como índice da concentração de clorofila, as quais são expressas em unidades de clorofila ou índice de clorofila. Foram utilizadas as médias de dez leituras por folha.

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi estimada usando um fluorômetro portátil modelo Handy-PEA (Hansatech Instruments®, King's Lynn, Norfolk, UK), entre 7h e 9h da manhã (horário solar). Previamente às leituras, as folhas foram adaptadas ao escuro por 40 minutos, tempo necessário para a oxidação completa dos centros de reação. Foram utilizadas como replicatas duas folhas em cada uma das cinco plantas de cada tratamento. A emissão da fluorescência foi induzida em uma área de 4 mm de diâmetro da folha, com um pulso de luz vermelha (650 nm) saturante ($3.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As intensidades de fluorescência foram registradas entre 10 μs e 1s. Foram utilizadas a fluorescência inicial (F_0) em 20 μs e a máxima (F_M) em aproximadamente 400 ms para calcular os parâmetros estabelecidos pelo Teste JIP (Strasser and Strasser, 1995; Strasser et al., 2000) que se baseiam na Teoria de Fluxo de Energia

em Biomembranas (Strasser et al., 2010) bem como as diferenças na cinética de emissão da fluorescência (Anexo E).

O transiente OJIP foi normalizado entre os pontos O e P e expressa como fluorescência variável relativa $[V_t = (F_t - F_0)/(F_M - F_0)]$. A diferença cinética foi obtida por meio da equação $(\Delta V_t = [V_{t(\text{tratamento})} - V_{t(\text{controle})}])$.

5.4 Diagnóstico molecular dos vírus associados à meleira por RT-PCR

Após 42 dias de inoculação foram coletadas amostras de folhas jovens nos três grupos em estudo (Controle, ↓[PMeV2] e ↑[PMeV2]). As amostras coletadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para as análises moleculares.

A presença e a carga viral foram confirmados por RT-PCR de acordo com Abreu et al. (2012). O RNA total foi extraído de amostras de látex utilizando o reagente Trizol (Ambion, Foster City, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi ressuspenso em 20 µL de água livre de nucleases e armazenado a -80 °C. A qualidade e pureza do RNA purificado foram avaliadas com base na relação A260/280 utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA). O RNA extraído (1 ug) foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA tratado foi utilizado na síntese da fita de DNA complementar (cDNA). As reações de transcrição reversa foram realizadas utilizando 10 µL do RNA tratado, 1 µL de olinucleotídeos randômicos (250 µM) (Invitrogen, Carlsbad, USA) e 1 µL de dNTP mix 10mM. A desnaturação do dsRNA do PMeV foi realizada a 96 °C por 3 min enquanto a do ssRNA do PMeV2 a 70°C por 10 min. Em seguida foi adicionado 4 µL do tampão de enzima 5X First- Strand Buffer, 1 µL de DTT 0,1 M e 1 µL da enzima M-MLV transcriptase reversa (200 U/µl) (Invitrogen, Carlsbad, USA) em um volume final de 20 µl. Posteriormente a amostra foi incubada a 37 °C por 50 min para a síntese do cDNA e 75 °C por 15 min para a inativação da enzima.

Nas reações de PCR foi utilizada a enzima recombinante Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA) seguindo as instruções do fabricante em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, Hauppauge, USA). Na reação de PCR utilizou-se 1,25 µL de cada par de oligonucleotídeo 10 µM (Tabela 1), 2,5 µL de 10X PCR Buffer, 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM, seguida de 0,5 µL de dNTP 10mM, 0,5 µL de recombinant Taq DNA Polymerase, 2 µL do cDNA em um volume de final de 25 µL. As reações foram realizadas utilizando o seguinte programa: 94 ° C durante 3 min, seguido por 35 ciclos de 94 ° C durante 45 s, 62 ° C durante 30 s , 72 ° C durante 1 minuto, e uma extensão final de 10 min a 72 ° C. Os produtos da amplificação foram visualizados em géis de agarose a 1,0%.

5.5 Delineamento experimental e análise estatística

O experimento foi realizado na área experimental do Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), da Universidade Federal de Espírito Santo (UFES). O delineamento experimental foi completamente casualizado, sendo três tratamentos, com cinco repetições (Controle= sem inoculação, ↓[PMeV2]= inoculadas somente com o tampão fosfato de sódio e ↑[PMeV2]= inoculadas com o latex de plantas com meleira). Cada vaso contendo uma planta foi considerado uma unidade experimental. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade, usando o software SAS v.9.0 (Institute Inc., Cary, NC, USA).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Escolheu-se por adotar o conceito de rendimentos quânticos complementares do FSII [Y(II), Y(NPQ) e Y(NO)] por ser bastante prático para a análise do desempenho fotossintético das plantas com base no método do pulso de saturação. O Y(II) corresponde à fração de energia que é convertida fotoquimicamente no FSII e pode ser facilmente descrito como rendimento quântico do FSII em amostras adaptadas à luz. O Y(NPQ) corresponde à fração de energia dissipada como calor ou a fração de

fótons absorvidos pelo sistema antena do FSII. Segundo Mishra et al. (2017), valores elevados deste parâmetro são indicativos de estratégias de proteção do FSII. O $Y(NO)$ reflete a fração de energia que é passivamente dissipada sob a forma de calor e fluorescência, principalmente devido ao fechamento dos centros de reação do FSII (DOS ANJOS et al., 2012; KRAMER et al., 2004; LEI et al., 2016)

Os resultados obtidos para a fluorescência modulada por imagem em plantas do mamoeiro cultivar Golden após um e 42 DAI das plantas com o látex de plantas com meleira estão apresentados na Figura 1.

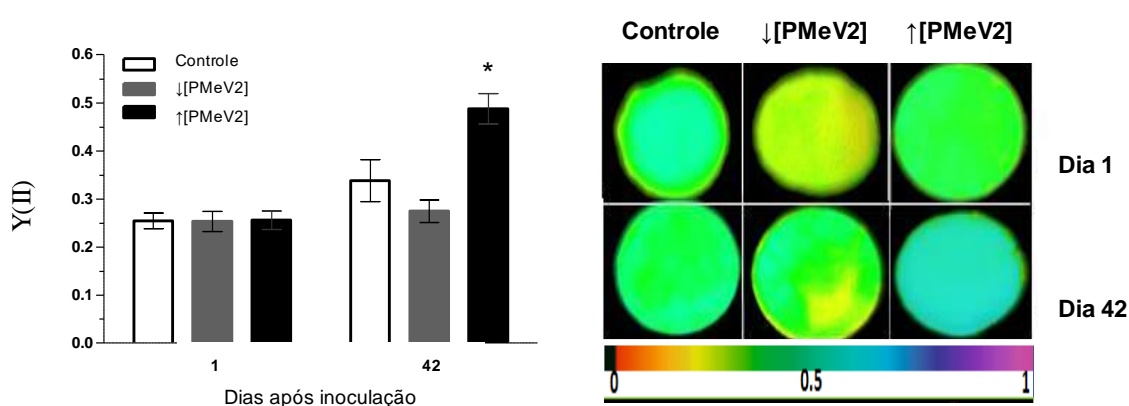


Figura 1. Rendimento quântico efetivo do fotossistema II [$Y(II)$] obtidos em plantas do mamoeiro 'Golden' cultivadas em casa de vegetação (1 e 42 DAI). O código falso de cor, representado na parte inferior das imagens, varia de 0,00 (preto) a 1,00 (rosa), respectivamente. Asterísco representa diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo período ($P < 0,001$). DAI=dias após a inoculação. ($n=4$).

De acordo com estudos pioneiros sobre o uso da fluorescência modulada por imagem vários parâmetros podem ser alterados pela presença de infecções causadas por vírus (DÍAZ-VIVANCOS et al., 2008; MAULE et al., 1996; LLAVE, 2016). Neste experimento observou-se que no primeiro DAI (Figura 1), não houve diferença significativa no rendimento do FSII, $Y(II)$, entre os tratamentos. Entretanto, aos 42 DAI as plantas inoculadas com o complexo PMeV e PMeV2 apresentaram um rendimento quântico do FSII estatisticamente superior em relação ao controle e ao tratamento ↓[PMeV2] sugerindo uma demanda energética maior nas plantas infectadas com o complexo viral. A análise do rendimento quântico do FSII já foi utilizada em numerosos estudos para avaliar a energia fotoquímica no FSII em estresse biótico e mais

especificamente as alterações causadas por vírus. Assim, nossos resultados foram similares àqueles obtidos por DÍAZ-VIVANCOS et al. (2008). Os autores destacam a importância do uso do $Y(II) = \Phi_{PSII}$ como um parâmetro sensível à infecção causada por *Plum pox virus* (PPV) mesmo na fase inicial da infecção. Relatam ainda que o efeito causado por este vírus aumentou as EROs, sugerindo que os cloroplastos podem ser uma fonte de estresse oxidativo em fase inicial do desenvolvimento da doença e como consequência observaram também a relação entre a fotossíntese e o metabolismo de carboidratos três dias após a infecção.

Infecções por vírus causam mudanças metabólicas, nos teores de carboidratos, aminoácidos e lipídios que, eventualmente, levam ao aumento das taxas de respiração e/ou diminuição da atividade fotossintética. Com isso, as plantas fornecem aclimação metabólica contra o estresse celular e atendem ao aumento da demanda por energia necessária para manter a multiplicação do vírus, constituindo uma resposta de defesa vegetal contra vírus (MAULE et al., 1996; LLAVE, 2016). Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o aumento na eficiência fotoquímica do FSII observado aos 42 DAI se deve a uma resposta de defesa da planta ao complexo viral PMeV e PMeV2. As imagens das amostras obtidas com o fluorômetro por imagem (PAM) representam valores em uma escala de 0,0 a 10 (unidades relativas) onde diferenças mais notáveis aos 42 DAI puderam ser observadas. As mudanças nas cores da amostra do tratamento \uparrow [PMeV2] com cores nas tonalidades azulada destaca-se aos 42 DAI ao redor de 0,45 em relação aos demais tratamentos (0,25 e 0,26 respectivamente).

Considerando que a medida do parâmetro $Y(NPQ)$ fornece uma estimativa do nível de densidade de fluxo de fótons na cadeia transportadora de elétrons, pôde-se observar, conforme mostrado na Figura 2, que as folhas das plantas do tratamento \uparrow [PMeV2], aumentaram os meios fisiológicos para se proteger por regulação após 1 DAI (KRAMER et al., 2004).

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Balachandran et al. (1994), os quais sugerem que valores elevados de NPQ no início ou durante a infecção viral é uma resposta de defesa do hospedeiro para atrasar a fotoinibição até o final da infecção.

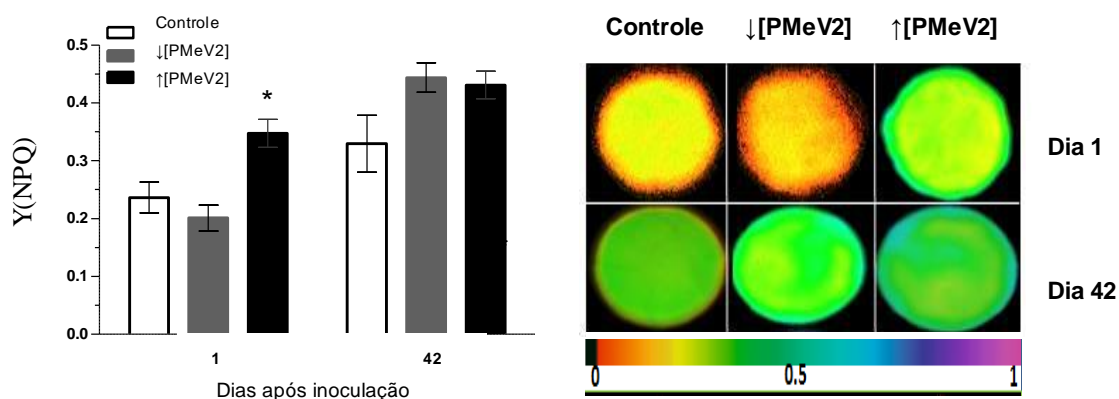


Figura 2. Fração de energia dissipada como calor [Y (NPQ)] de plantas do mamoeiro ‘Golden’ cultivadas em casa de vegetação (1 e 42 DAI). Mudanças relativas dos valores médios e Imagens da fluorescência modulada. O código falso de cor, representado na parte inferior das imagens, varia de 0,00 (preto) a 1,00 (rosa), respectivamente. Asterísco representa diferença estatística entre os tratamentos em um mesmo período ($P < 0,001$). DAI=dias após a inoculação. (n=4).

Considerando que Y (NPQ)] representa o rendimento induzido por processos de regulação negativa associada à dissipação térmica controlada, os valores observados nas plantas infectadas pelo vírus da meleira parecem indicar estratégias de proteção no FSII. Em um estudo feito com o vírus de pimentão (*Pepper mild mottle virus*), PMMoV-I que ocorre na Itália e PMMoV-S na Espanha, plantas de *Nicotiana benthamiana* foram inoculadas e avaliadas usando a técnica de fluorescência da clorofila a por imagem para detectar danos causados pelos dois vírus. O parâmetro utilizado, NPQ (dissipação de energia não fotoquímica), mostrou-se efetivo para a detecção dos sintomas da infecção em fase intermediária nas folhas de *N. benthaminiana* (PINEDA et al., 2008).

A análise das curvas OJIP resultantes da fluorescência transiente da clorofila a permitiu deduzir que a inoculação e, principalmente a carga viral, provocaram mudanças nas reações de oxido-redução associadas aos Fotossistemas I e II, tanto no lado aceptor quanto no lado doador de elétrons. As curvas são apresentadas numa escala temporal logarítmica de 0,01 a 1s e, após a normalização, foi calculada a fluorescência variável [$V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$].

A Figura 3 mostra dois conjuntos de curvas OJIP associadas à diferença da fluorescência variável (ΔV_t), por meio das quais justificam-se as diferenças observadas entre os tratamentos. Também esclarecem a questão, inicialmente levantadas: as diferenças observadas nas curvas OJIP poderiam ser atribuídas à carga viral ou ao estresse mecânico?. Assim, comparou-se as curvas OJIP dos três tratamentos no dia um e 42 DAI.

De fato, existiram maiores diferenças entre as plantas Controle e as plantas onde ocorreram a inoculação com látex contaminado (PMeV2) e essas diferenças aparecem, principalmente, aos 42 DAI destacando-se como ΔV_t negativas entre as fases O-J e J-I (que representam a redução do lado aceptor do FSII (Q_A e Q_B) e que reflete a progressiva redução do *pool* de plastoquinona, respectivamente) (STRASSER et al, 2004; SCHANSKER et al., 2005; TÒTH, 2006; YUSUF et al., 2010).

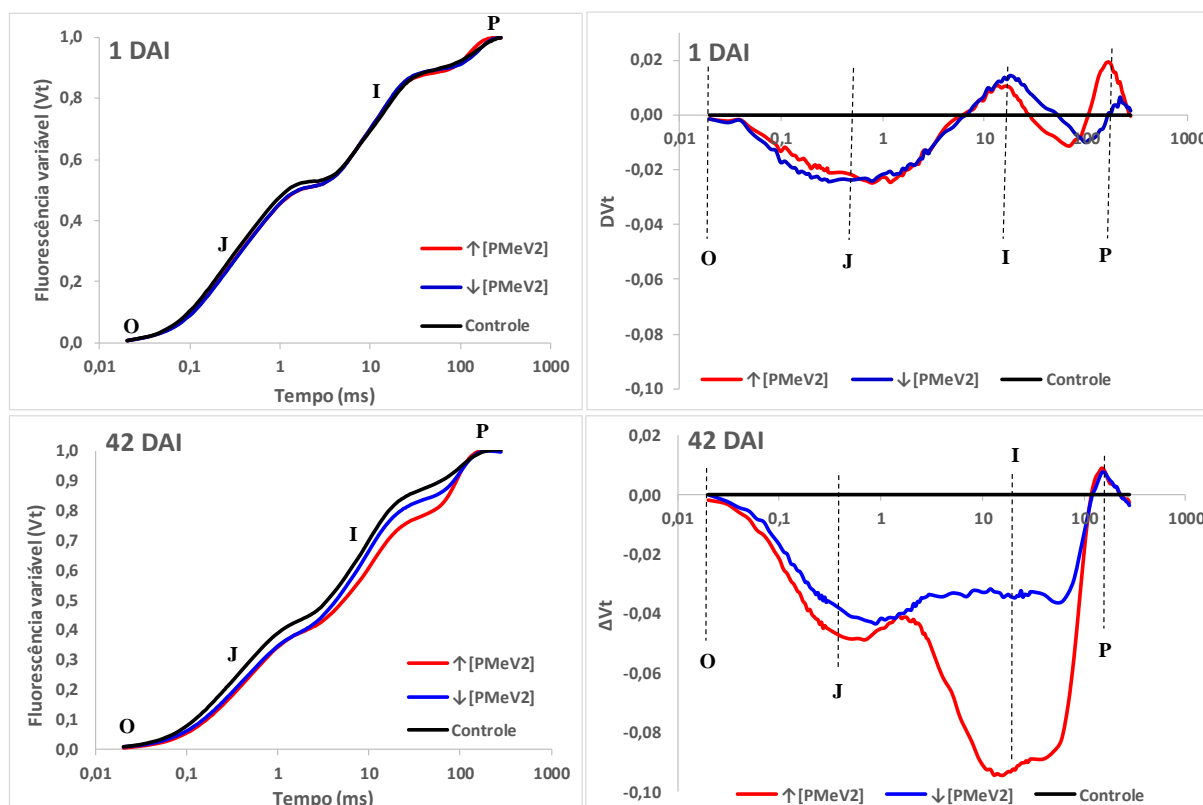


Figura 3. Curvas da indução da fluorescência variável relativa da clorofila *a* e diferenças cinéticas normalizadas ($\Delta V_t = V_{t(\text{tratamento})} - V_{t(\text{controle})}$) de plantas de *Carica papaya* L. cv. Golden cultivadas em uma casa de vegetação do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Medidas realizadas aos um e 42 dias após a inoculação (DAI). O tempo está representado em escala logarítmica (ms). (n=5)

Observa que a diferença da fluorescência variável (ΔV_t) entre as plantas Controle e as plantas \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2] na fase O-J tornou-se gradativamente mais negativa, sugerindo maior eficiência na redução dos aceptores primários (Q_A) e secundários (Q_B) de elétrons no FSII. Interessante notar, também, que um DAI quando de comparou a fase O-J entre \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2] os valores de ΔV_t foram bem semelhantes.

Na fase J-I as diferenças entre o Controle e os tratamentos \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2] são bem evidentes, i.e., uma pequena diferença positiva apareceu 1 DAI e uma diferença negativa aos 42 DAI. Ora, a fase J-I tem propriedades cinéticas relacionadas à progressiva redução do *pool* de PQ (TÓTH et al., 2007) enquanto que o ponto I (V_I ou V_{30ms}) reflete predominantemente o fechamento fotoquímico dos centros de reação não redutores de Q_B do FSII (centros que não podem reduzir outros aceitadores de elétrons, além de Q_A). Segundo Sušila et al. (2004) um aumento do ponto I em condições de baixa irradiância (caso do experimento deste trabalho pois a RFA dentro da casa de vegetação era em média $680 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) deve ser interpretada com cuidado, uma vez que experimentos realizados pelo grupo com algas e com folhas mostram que o gradiente de radiação pode afetar significativamente a determinação da quantidade relativa dos centros de reação não redutores de Q_B do FSII.

Entretanto, torna-se necessário destacar que os maiores valores de ΔV_t foram observados quando se comparou o Controle com o \uparrow [PMeV2] na fase J-I e I-P. Os dois processos envolvidos nesta fase: a redução do *pool* de PQ e uma perda concomitante do poder *quenching* de PQ são cineticamente independentes (STRASSER et al., 2010) embora nas plantas \uparrow [PMeV2] estivessem ocorrendo concomitantemente. Ambas as fases com amplitude negativa aos 42 DAI sugerem maior eficiência de redução do *pool* de plastoquinonas (PQ) e consequente maior eficiência na redução dos aceptores de elétrons do complexo Cit_{b6f} .

Aos 42 DAI foram realizadas análises para o diagnóstico da meleira nas plantas Controle, \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2] usando a técnica de RT-PCR. Os resultados encontram-se na Figura 4 e evidenciam a alta carga do vírus PMeV em todas as folhas amostradas. As plantas denominadas \downarrow [PMeV2] foram aquelas que receberam apenas o tampão fostato e possuíam, aos 42 DAI baixa carga do vírus PMeV2viral,

enquanto as plantas denominadas \uparrow [PMeV2] foram aquelas inoculadas com o látex de plantas com meleira e possuíam alta carga do vírus PMeV2. Estes resultados confirmam aqueles encontrados por Antunes (2016) primeiro a relatar a presença de um complexo viral em mamoeiro. Segundo o autor, a presença do vírus PMeV foi detectada em todas as plantas analisadas, sintomáticas ou assintomáticas para a meleira. Este vírus é identificado como um vírus de partícula isométrica e genoma composto por uma única molécula de RNA fita dupla (dsRNA). É necessário destacar que nenhuma das plantas amostradas neste trabalho possuíam sintomas visíveis da meleira, porém foi possível visualizar a banda de amplificação do PMeV em todas as amostras (banda na faixa de 400 pb). Nas plantas inoculadas com o látex das plantas com meleira observou-se a presença de uma segunda banda (750 pb), confirmando as afirmativas de Antunes (2016) da existência de um segundo vírus com RNA de fita simples (ssRNA) denominado PMeV2.

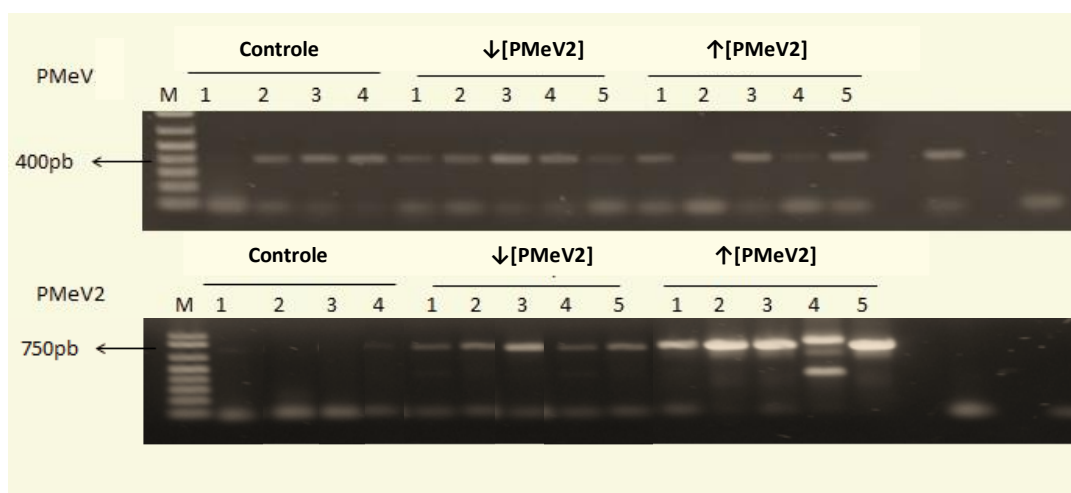


Figura 4. Padrão de bandas obtido a partir do RNA total extraído de folhas do mamoeiro 'Golden' aos 42 dias após o início do tratamento. 400pb = Banda do RNA correspondente ao PMeV; 750pb = Banda do RNA correspondente ao PMeV2. MP = Marcador de Peso Molecular 1kpb.

O índice de clorofila, obtidos com um clorofilômetro portátil está representado na Figura 5. Observa-se que até 35 DAI as plantas controle possuíam maiores teores de clorofila quando comparados com o grupo \downarrow [PMeV2] e \uparrow [PMeV2]. Após 42 DAI as

plantas com maior carga viral (\uparrow [PMeV2]) possuíam maiores teores de clorofila quando comparadas com as plantas Controle e \downarrow [PMeV2].

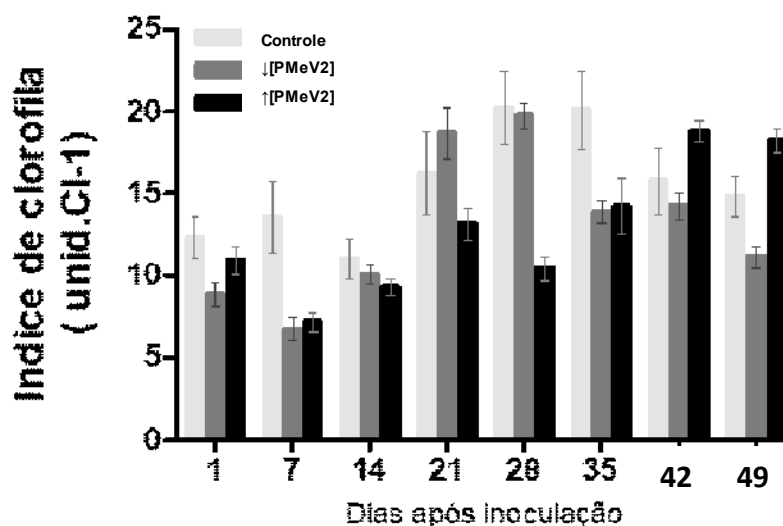


Figura 5. Índice de clorofila obtidos com um clorofilômetro portátil Mod. CI-01 de folhas do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden cultivados em casa de vegetação. Controle = plantas sem o vírus PMeV e PMeV2; \downarrow [PMeV2] = plantas com menor carga viral; \uparrow [PMeV2] = plantas com maior carga viral; DAI = dias após a inoculação. Medidas realizadas semanalmente durante todo o experimento. Barras indicam erro-padrão da media (n=10).

Os parâmetros fenomenológicos do Teste JIP foram empregados para analisar semanalmente cada transiente da fluorescência da clorofila *a* (Figura 6). O fluxo de absorção por seção excitada da folha amostrada (ABS/CS_0) pode ser tomado como uma medida para o tamanho médio de antena ou a concentração de clorofila. No 1º DAI as plantas com menor carga viral (\downarrow [PMeV2]) mostraram uma queda nos fluxos de absorção (ABS/CS_0) bem como no fluxo de captura (TR_0/CS_0) e transporte (ET_0/CS_0) da energia luminosa. Essa queda persistiu até os 25 DAI o que pode indicar baixa capacidade de autoproteção. Porém, o fluxo de elétrons redutores dos aceptores de elétrons do FSI aumentou a partir do 35º DAI e permaneceu alto até o 49 DAI.

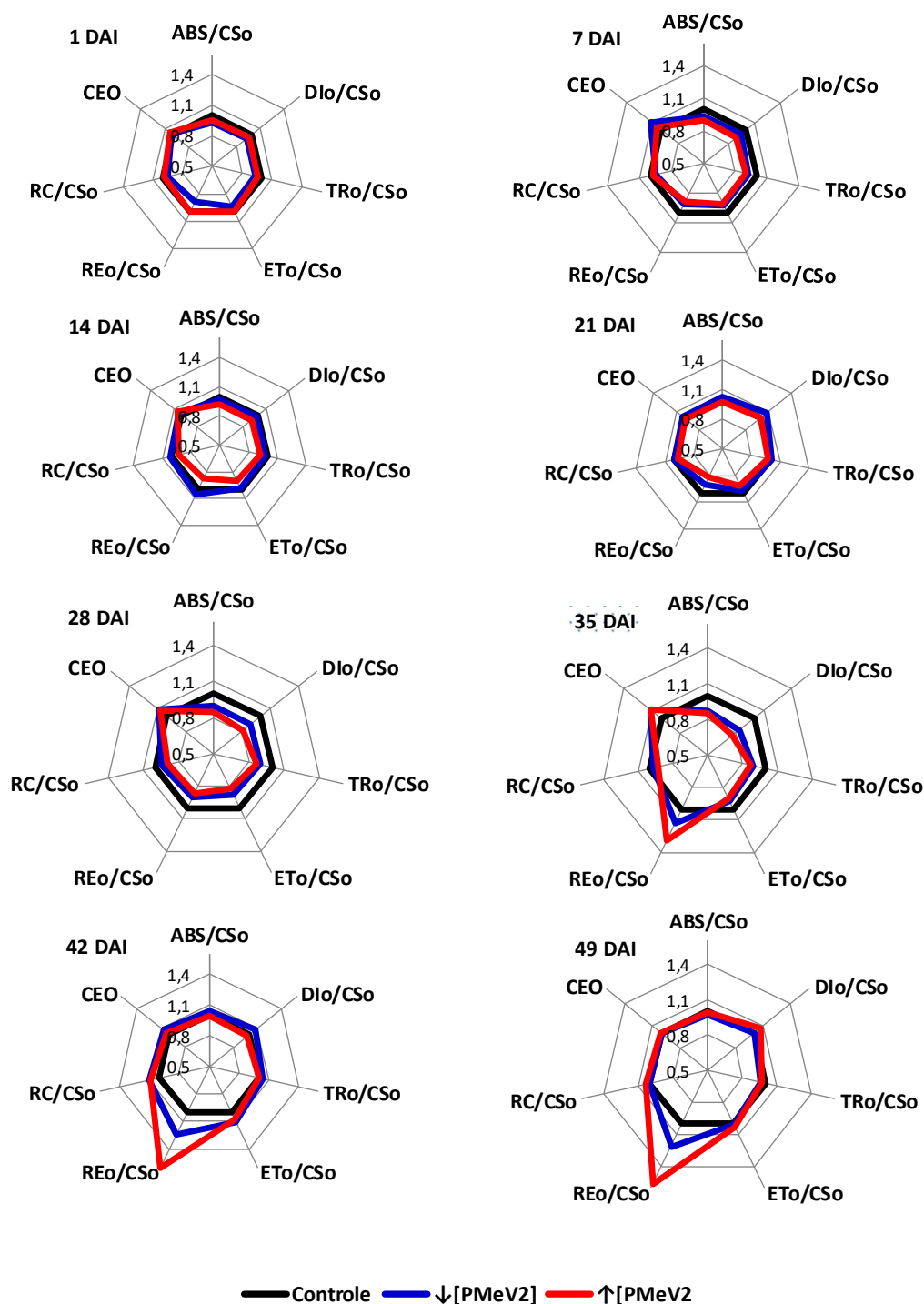


Figura 6. Parâmetros fenomenológicos calculados pelo teste JIP e plotados em radar em escala logarítmica. Para cada parâmetro, o valor médio das plantas Controle foi usado como base para a normalização. Os dados foram obtidos em plantas do mamoeiro 'Golden' cultivadas em uma estufa agrícola do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Controle = plantas sem o vírus PMeV e PMeV2; ↓[PMeV2] = plantas com menor carga viral; ↑[PMeV2] = plantas com maior carga viral; DAI = dias após a inoculação. Medidas realizadas semanalmente durante todo o experimento. (n=6).

Resultados contrários aos obtidos com o \uparrow [PMeV2] foram descritos em um estudo realizado com geminivirus onde foram induzidos sintomas por um betasatélite como regulador chave de sintomas da doença do rananete (RaLCB) em *Nicotiana bethamiana*. O estudo envolveu a proteína β C1 localizada em cloroplastos de células hospedeiras. Em células hospedeiras sem β C1 não foram observados os sintomas da doença

Observou-se que os valores de absorção da energia luminosa por centro de reação (ABS/RC) aumentaram e que a eficiência no aprisionamento da energia por centro de reação (TR_0 /RC) decresceu em plantas contendo a proteína β C1. Além disso, os RCs foram incrementados por causa da dissipação de calor indicando altos níveis de excitação para processos não fotoquímicos (BHATTACHARYYA et al., 2015).

Aos 42 e 49 DAI as plantas \uparrow [PMeV2] destacam-se dos outros dois tratamentos pela mais alta eficiência de redução dos transportadores de elétrons no FSI (RE_0/CS_0). Estes resultados parecem confirmar aqueles obtidos por Soares et al. (2017) durante a pré-floração de mamoeiros Golden infectados com o vírus da meleira. A análise proteômica evidenciou proteínas das sub-unidades 1 e 0 do FSI acumuladas diferenciadamente e positivamente reguladas.

Também é interessante ressaltar que os centro de reação do Complexo de Evolução de Oxigênio (CEO) e a densidade dos CR ativos por secção transversal das folhas excitadas (RC/CS_0) foram pouco alterados durante o período avaliado. Porém aos 42 e 49 DAI houve um aumento em RC/CS_0 nas plantas contendo menor e maior carga viral. Nos dois tratamentos, ficou bem evidente a ativação dos CRs do FSII que pode ser resultado do estresse causado pelo vírus.

O índice de desempenho do FSII (PI_{ABS}) é o parâmetro do teste JIP mais sensível aos estresses bióticos e abióticos (Figura 7). O PI_{ABS} é uma expressão que contém três componentes: (i) um componente referente à densidade de centros de reação ativos do FSII por molécula de clorofila (RC / ABS), (ii) um componente que descreve o desempenho das reações de luz indicado pela equação $\phi P_0 / (1-\phi P_0) = F_v / F_0$ e (iii) um componente que descreve o desempenho das reações de óxido-redução no escuro definidas como $\psi E_0 / (1-\psi E_0) = (F_M - F_J) / (F_J - F_0)$ (Strasser et al., 2010; Chen et al., 2011).

Na Figura 7 observa-se que as plantas que continham menor carga viral possuíam um PI_{ABS} muito semelhante às plantas com maior carga viral. Entretanto, após 35 dias observa-se comportamento bem destacado. As plantas com menor carga viral apresentavam PI_{TOTAL} intermediário, isto é, menor que as plantas com maior carga viral, porém maior do que as plantas Controle.

Nota-se aumento no desempenho das reações de óxido-redução no escuro, evidenciado pelos maiores valores de escuro $\psi E_0 / (1-\psi E_0)$, refletindo, com isto, os aumentos no índice de desempenho do FSII (PI_{ABS}). Ocorreu, também, um aumento gradativo a partir do 35º DAI no desempenho das reações de óxido-redução do FSI ($\delta R_0 / (1-\delta R_0)$) e, assim, ocorreu um aumento considerável no índice de desempenho dos fótons absorvidos pelo FSII para a redução dos aceptores finais do FSI (PI_{TOTAL}).

Esses resultados confirmam aqueles obtidos por Madroñero (2014) em plantas do mamoeiro com sintomas da meleira, detectando o envolvimento de genes do metabolismo fotossintético nas respostas de resistência.

Soares et al. (2017) observaram acúmulo diferencial de proteínas positivamente reguladas, como as proteínas das subunidades R, Proteína H e V, PsbQ do FSII, as proteínas das sub unidade 0 e 1 do FSI, proteínas da ATP sintase cloroplastídica (subunidade CF0 A e sub unidade CF1 ϵ) além da Ribulose bifsosfato carboxilase.

Além disso, esses resultados também confirmam aquele obtidos por Antunes (2016), que demonstrou a presença de um segundo vírus com fita simples (ssRNA), agora identificado como PMeV2, cuja funcionalidade engloba maior atividade do metabolismo primário. Maldoñero (2017) destaca genes do metabolismo fotossintéticos que foram induzidos durante a pré-floração.

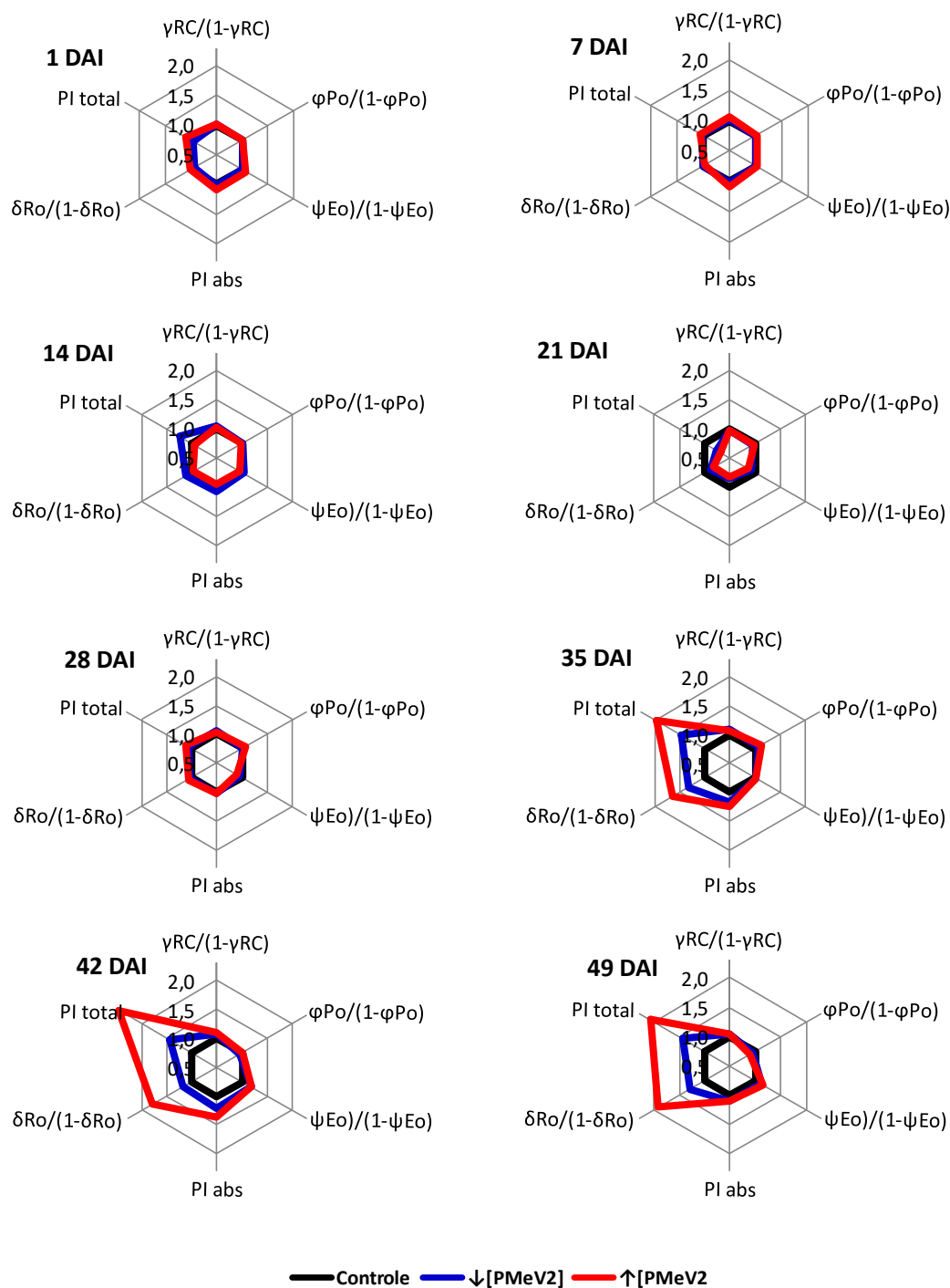


Figura 7. Parâmetros de desempenho fotoquímico calculados pelo teste JIP e plotados em escala logarítmica. Para cada parâmetro, o valor médio das plantas Controle foi usado como base para a normalização. Os dados foram obtidos em plantas do mamoeiro ‘Golden’ cultivadas em uma estufa agrícola do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo. Controle = plantas sem o vírus PMeV e PMeV2; ↓[PMeV2] = plantas com menor carga viral; ↑ [PMeV2] = plantas com maior carga viral; DAI = dias após a inoculação. Medidas realizadas semanalmente durante todo o experimento. (n=6).

As alterações no metabolismo fotoquímico detectadas neste trabalho foram estimadas em plantas jovens antes do estágio de pré-floração. Estas plantas, ainda com tamanho de mudas de viveiro, mostraram alterações na etapa fotoquímica da fotossíntese que somente um método rápido, prático e bastante confiável tal como a fluorescência da clorofila *a* é capaz de detectar. Torna-se necessário, portanto, a continuidade deste trabalho para maiores esclarecimentos sobre os mecanismos de tolerância ao vírus PMeV e da participação do metabolismo primário na indução de resistência do mamoeiro em estádios iniciais do desenvolvimento.

7. CONCLUSÕES

Considerando que:

- A fluorescência modulada da clorofila *a* evidenciou um aumento significativo na produção quântica de conversão de energia fotoquímica do fotossistema II ($Y(II)$) e um aumento do rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica regulada [$Y(NPQ)$] nas plantas inoculadas com látex de plantas com meleira;
- A fluorescência transiente da clorofila *a* demonstrou que plantas com maior carga viral apresentam maior atividade redutora do fotossistema I e maior índice de desempenho fotoquímico total (PI_{total});
- Parâmetros da fluorescência da clorofila *a* poderiam confirmar que a meleira do mamoeiro está associada à infecção mista pelo PMeV e PMeV2

É possível sugerir que a técnica da fluorescência da clorofila *a* possui grande potencial como um método simples e rápido para uso na detecção de infecção de vírus em plantas.

REFERÊNCIAS

- ABREU, P. M. V. **Envolvimento de microRNAs NA INTERAÇÃO *Carica papaya* L. e *Papaya meleira* virus com potencial biotecnológico**. 2015. 110f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) RENORBIO, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.
- ABREU, P. M. V.; PICCIN, J. G.; RODRIGUES, S. P.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Molecular diagnosis of *Papaya meleira* virus (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.180, p.11-17, 2012.
- ANTUNES, T. F.; AMARAL, R. J. V.; VENTURA, J. A.; GODINHO, M. T.; AMARAL, J. G.; SOUZA, F. O. The dsRNA virus *Papaya meleira* virus and an ssRNA virus are associated with papaya sticky disease. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–14, 2016.
- ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: From genes to the field. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 10, p. 3523–3544, 2012.
- BADILLO, V. M. *Carica* L. vs *Vasconcella* St. Hil. (Caricaceae): com le rehabilitación de este último. **Ernstia**, Macaray, v.10, n.10, p. 74-79, 2000.
- BALACHANDRAN, S.; OSMOND, C. B.; DALEY, P.F. Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. **Plant Physiology**, v.104, p.1059–1065, 1994.
- BHATTACHARYYA, D.; CHAKRABORTY, S. Chloroplast: The Trojan Horse in Plant-Virus Interaction. **Molecular Plant Pathology**, 2017. DOI: 10.1111/mpp.12533
- BHATTACHARYYA, D.; GNANASEKARAN, P.; KUMAR, R. K.; KUSHWAHA, N. K.; SHARMA, V. K.; YUSUF, M. A.; CHAKRABORTY, S. A geminivirus betasatellite damages the structural and functional integrity of chloroplasts leading to symptom formation and inhibition of photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 19, p. 5881–5895, 2015.
- BILGIN, D. D.; ZAVALA, J. A.; ZHU, J.; CLOUGH, S. J.; ORT, D. R.; DeLUCIA, E. H. Biotic stress globally downregulates photosynthesis genes. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 10, p. 1597–1613, 2010.
- CHEN, I. C. *et al.* Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. **Science**, v. 333, n. 6045, p. 1024–1026, 2011.
- DALTRO, C. B.; ABREU, E. F. M.; ARAGÃO, F. J. L.; ANDRADE, E. C. Genetic diversity studies of *Papaya meleira* virus. **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.1, p.104-108, 2014.
- DÍAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; RUBIO, M.; OLMOS, E.; GARCÍA, R. A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, P.; HERNÁNDEZ, J. P. Alteration in the

chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to plum pox virus. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p. 2147–2160, 2008.

DOS ANJOS, L.; OLIVA, M. A.; KUKI, K. N. Fluorescence imaging of light acclimation of brazilian atlantic forest tree species. **Photosynthetica**, v.50, n.1, p.95-108, 2012.

FAOSTAT Statistics Division. 2014. Disponível em: < <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E> >. Acesso em: 16 de janeiro de 2017.

GUIDI, L.; DEGL'INNOCENTI, E. Ozone effects on high light-induced photoinhibition in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Science**, v.174, p. 590-596, 2008.

KITAJIMA, M.; BUTLER, W. L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymol quinone. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.376, p.105-115, 1975.

KRAMER, D. M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O.; EDWARDS, G. E. New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research**, v. 79, n. 2, p. 209–218, 2004.

LEI, R.; JIANG, H.; HU, F.; YAN, J.; ZHU, S. Chlorophyll fluorescence lifetime imaging provides new insight into the chlorosis induced by plant virus infection. **Plant Cell Reports**, v. 36, n. 2, p. 1–15, 2016.

LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA JR, M. T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, v.26, n.4, p.689-702, 2001.

LLAVE, C. Dynamic cross-talk between host primary metabolism and viruses during infections in plants. **Current Opinion in Virology**, v. 19, p. 50–55, 2016.

LUCK, J.; SPACKMAN, M.; FREEMAN, A.; TRĘBICKI, P.; GRIFFITHS, W.; FINLAY, K.; CHAKRABORTY, S. Climate change and diseases of food crops. **Plant Pathology**, v. 60, n. 1, p. 113–121, 2011.

MADROÑERO, L. J.. Análise transcriptômica da interação mamoeiro - *Papaya meleira* virus. 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, 2014.

MANICA, I.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. **Taxonomia, morfologia e anatomia**. In: MANICA, I. (Ed.). **Mamão: tecnologia de produção, pós-colheita, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes. cap. 2, p. 19-32, 2006.

MAULE, A. J.; WANG, D. Seed transmission of plant viruses: A lesson in biological complexity. **Trends Microbiology**. v.4, p.153-158, 1996.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MIOTTO-VILANOVA, L.; JACQUARD, C.; COURTEAUX, B.; WORTHAM, L.; MICHEL, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A.; SANCHEZ, L. *Burkholderia phytofirmans* PsJN confers grapevine resistance against *Botrytis cinerea* via a direct antimicrobial

effect combined with a better resource mobilization. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p. 1–15, 2016.

PINEDA, M.; SOUKUPOVÁ, J.; MATOUŠ, K.; NEDBAL, L.; BARÓN, M. Conventional and combinatorial chlorophyll fluorescence imaging of tobamovirus-infected plants. **Photosynthetica**, v. 46, n. 3, p. 441–451, 2008.

RAO, A.; CHATURVEDI, S.; GARMANN, R. F. Integration of replication and assembly of infectious virions in plant RNA viruses. **Current Opinion in Virology**, v. 9, p.61–66, 2014.

RODRIGUES, S. P. et al. Effects of the *Papaya meleira* virus on papaya latex structure and composition. **Plant Cell Reports**, v. 28, n. 5, p. 861-871, 2009.

RODRIGUES, S. P. et al. Simplified molecular method for the diagnosis of *Papaya meleira* virus in papaya latex and tissues. **Summa Phytopathologica**, v. 31, p. 281-283, 2005.

SCHANSKER, G.; TÓTH, S. Z.; STRASSER, R. J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1706, p. 250–261, 2005.

SOARES, E. A.; WERTH, E. G.; MADROÑERO, L. J.; VENTURA, J. A.; RODRIGUES, S. P.; HICKS, L. M.; FERNANDES, P. M. B. Label-free quantitative proteomic analysis of pre-flowering PMeV-infected *Carica papaya* L. **Journal of Proteomics**, v.151, p.275–283, 2017.

STARE, T.; RAMŠAK, Z.; BLEJEC, A.; STARE, K.; TURNŠEK, N.; WECKWERTH, W.; WIENKOOP, S.; VODNIK, D.; GRUDEN, K. Bimodal dynamics of primary metabolism-related responses in tolerant potato-Potato virus Y interaction. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 716, 2015.

STRASSER, B.J.; STRASSER, R.J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: The JIP-test. In: MATHIS P. Photosynthesis: From Light to Biosphere. Dordrecht: **Kluwer Academic Public**. v. 5. pp. 977-980.1995.

STRASSER, R.J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pathre, U., Mohanty, P. (Ed.), **Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation**. Taylor and Francis. London. cap. 25. pp. 443–480. 2000.

STRASSER, R. J.; GOVINDJEE. On the O-J-I-P Fluorescence Transient in Leaves and D1 Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. In: Murata, N. (Ed), **Research in Photosynthesis**. v 2. pp.29-32. , 1992.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313-1326, 2010.

STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of fluorescence transient. In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (Ed.), *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*, **Springer, Dordrecht**, v. 19, pp. 321- 362, 2004.

TÓTH, S. Z.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. A non-invasive assay of the plastoquinone pool redox state based on the OJIP-transient. **Photosynthesis Research**, v. 93, n. 1–3, p. 193–203, 2007.

TRISSEL, H.-W.; GAO, Y.; WULF, K. Theoretical fluorescence induction curves derived from coupled differential equations describing the primary photochemistry of photosystem II by an exciton-radical pair equilibrium. **Biophysical Journal**, v. 64, n. 4, p.974–988,1993.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S.; ANDRADE, J.S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomas e epidemiologia. In: MARTINS, D. S. (Ed.). **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitória. Incaper. p.267-276. 2003.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S. Sintomatologia da meleira do mamoeiro e sua importância para o “roguing”. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 536-536, 2003.

VENTURA, J.A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J.S.; ANDRADE, J.S. Meleira do mamoeiro: etiologia, sintomatologia e controle. In: MARTINS D. Dos S. (Ed.) **Papaya Brasil: qualidade do mamão para o mercado interno**. Vitoria, ES: INCAPER. p. 267-276, 2003.

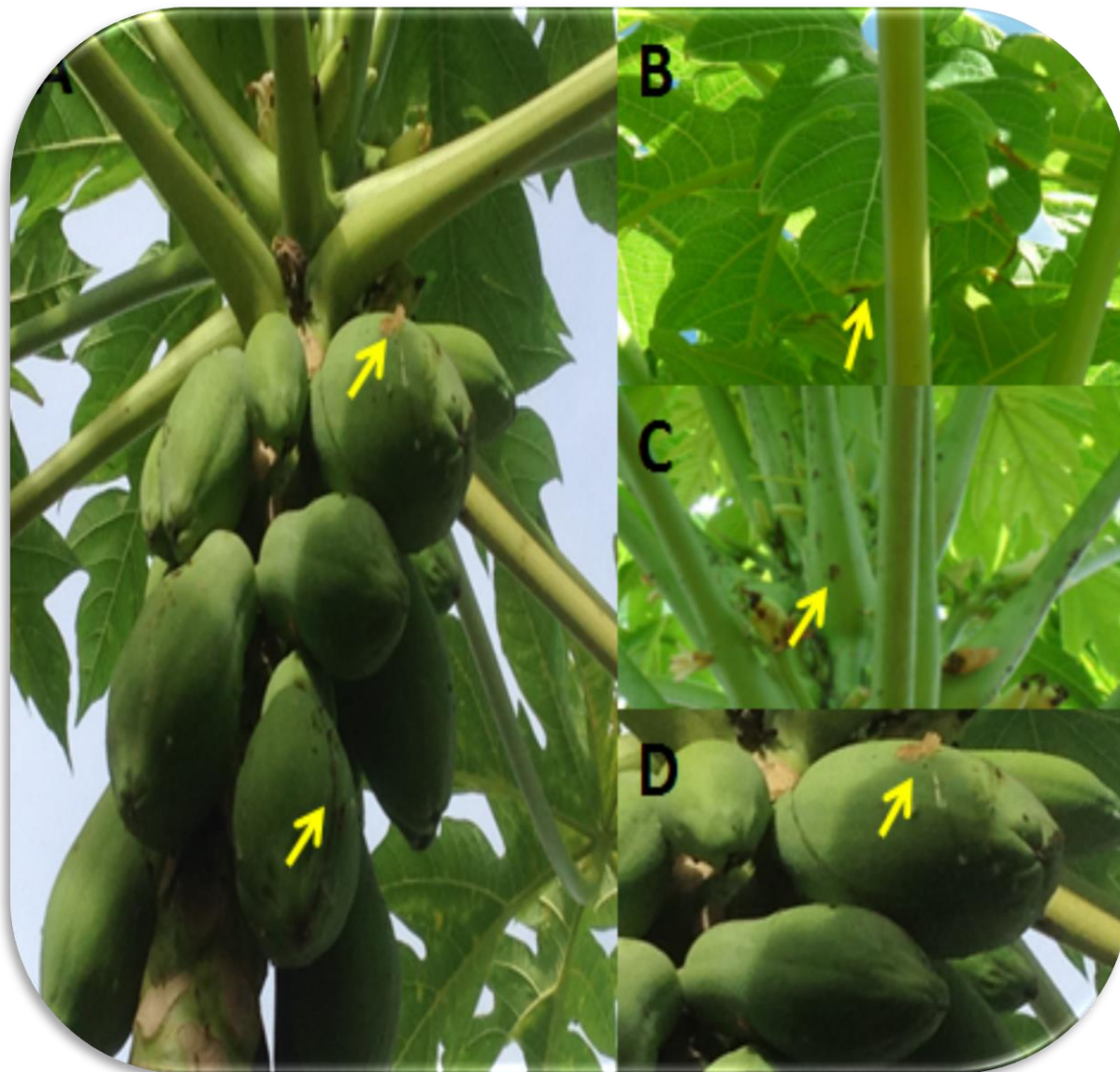
VENTURA, J. A.; COSTA, H.; TATAGIBA, J. S. Papaya diseases and integrated control. In: NAQVI, S. A. H. M. (Ed.). *Diseases of Fruits and Vegetables*: **Springer**, v.II,. p. 201-268, 2004.

YUSUF, M.A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R.J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N.B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic Brassica juncea plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438, 2010.

ZAMBOLIM, E. M.; ALONSO, S. K.; MATSUOKA; K. M.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M.; Purification and some properties of *Papaya meleira* virus, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v.52, p.389–394, 2003.

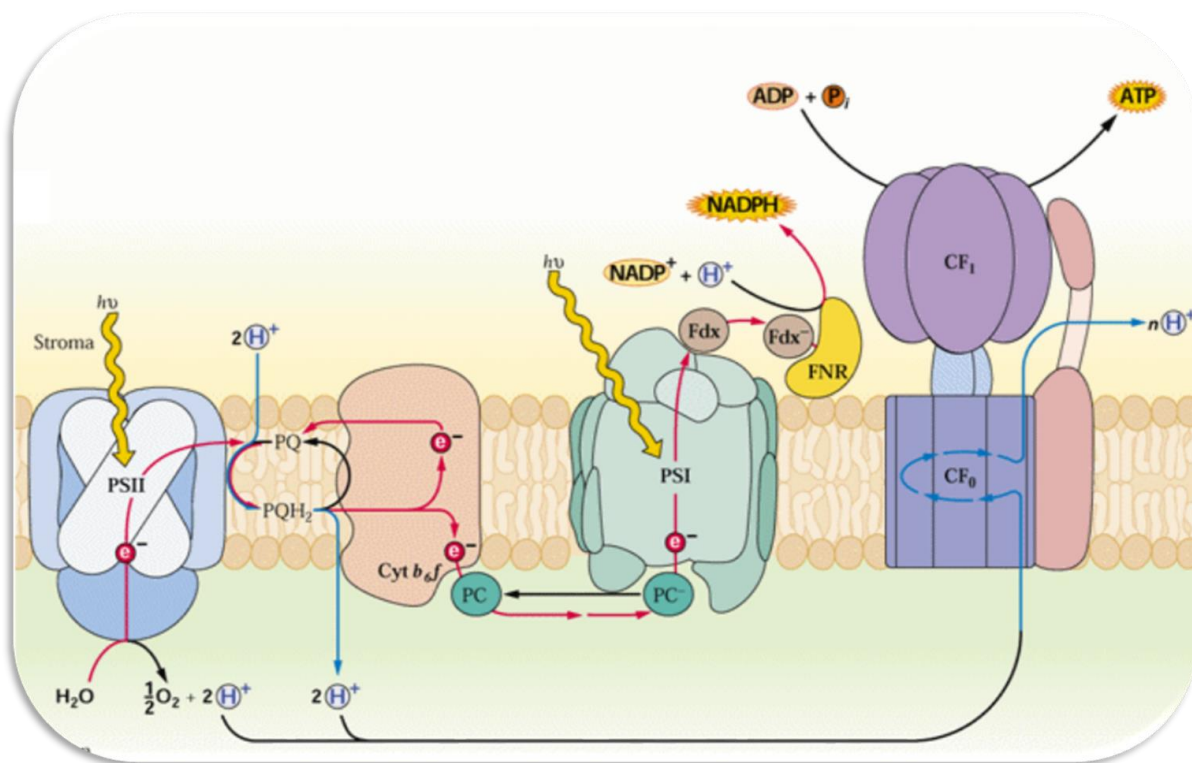
ANEXOS

ANEXO A



Mamoeiro (*Carica papaya*) com sintomas típicos da meleira. A, D) Exsudação espontânea de látex fluido e aquoso na superfície dos frutos; B) Pequenas lesões necróticas nas pontas de folhas jovens; e C) Exsudação de látex oxidado nos pecíolos das folhas. FONTE: Karla Hernández

ANEXO B



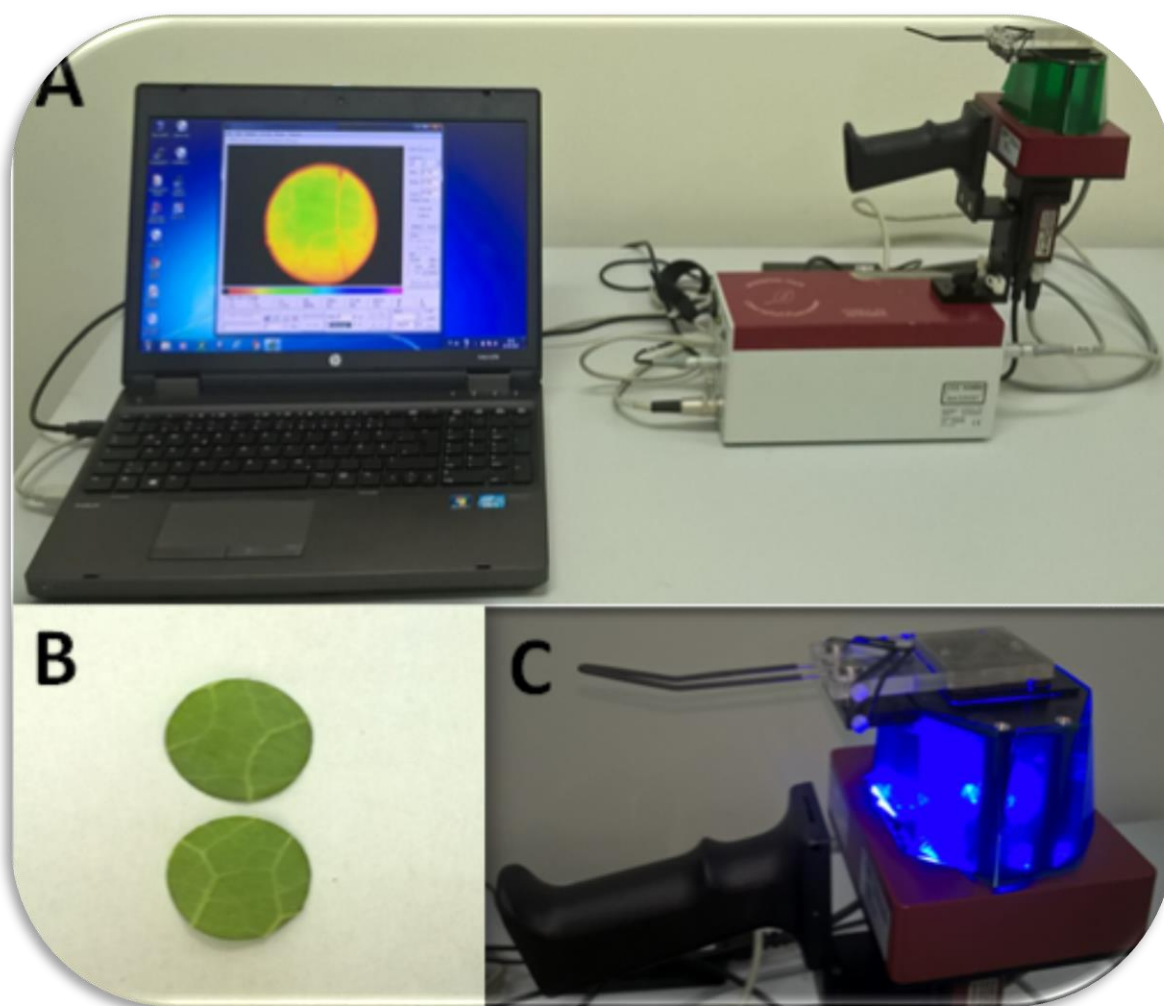
Modelo do esquema “Z” que representa o fluxo de transporte de elétrons pelos FSII e FSI, Govindjee et al., (2010).

ANEXO C



Plantas do mamoeiro (*Carica papaya* L.) cv. Golden, usadas no experimento e cultivadas desde a germinação em casa de vegetação do Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo em Vitória, ES.

ANEXO D



Fluorômetro de Pulso Modulado Imaging-PAM Mini-B (A), discos foliares de plantas de *Carica papaya* L. cv. Golden (B), medição da fluorescência modulada (C).

ANEXO E

Fórmulas e definições de parâmetros do Teste JIP segundo Strasser et al. (2004)

| Parâmetro | Fórmula | Descrição |
|----------------------------------|---|---|
| RC/CS ₀ | $\phi P_o(V_J/M_o)(ABS/CS)$ | Quantidade de centro de reação ativos do FSII por seção transversal excitada |
| TR ₀ /CS ₀ | $\phi P_o (ABS/CS)$ | Fluxo de energia capturada por CS no t=0 |
| ABS/CS ₀ | Chl/CS | Fluxo de absorção por seção transversal excitada (CS) no t=0 |
| ET ₀ /CS ₀ | $\phi P_o \cdot \Psi_o^+ (ABS/CS)$ | Fluxo de transporte de elétrons por CS no t=0 |
| CEO | $[1 - (V_K/V_J)_{tratamento}]/[1 - (V_K/V_J)_{controle}]$ | Fração de centros do complexo de evolução de oxigênio |
| Dl ₀ /CS ₀ | $ABS/RC - TR_0/RC$ | Fluxo de energia dissipada por CS no t=0 |
| RE ₀ /CS ₀ | $(RE_0/ET_0) - ET_0/CS_0$ | Fluxo de redução dos aceptores finais no lado receptor de elétrons do FSI por CS no t=0 |
| $\gamma_{RC}/(1-\gamma_{RC})$ | $RC/ABS = \phi P_o (V_J/M_o)$ | Densidade de centros de reação ativos do FSII por molécula de clorofila |
| $\phi P_o/(1-\phi P_o)$ | $TR_0/Dl_0 = kP/kN = FV/F_0$ | Desempenho das reações de luz |
| $\psi E_o/(1-\psi E_o)$ | $ET_0/(dQ_A/dt_0)$ | Desempenho das reações de oxirredução no escuro |
| $\delta R_o/(1-\delta R_o)$ | $(RE_0/ET_0)/(1-(RE_0/ET_0))$ | Desempenho das reações de oxirredução do FSI |
| PI abs | $(\gamma_{RC}/1-\gamma_{RC}) \cdot (\phi P_o/1-\phi P_o) \cdot (\Psi_o/1-\Psi_o)$ | Índice de desempenho do FSII |
| PI total | $PI_{ABS} \cdot (\delta R_o/1-\delta R_o)$ | Índice de desempenho total |
| Y(II) | $(F'_m - F_s)/F'_m$ | Rendimento quântico do FSII |
| Y(NPQ) | $1 - \phi PSII - 1/(NPQ + 1 + qL(F_M/F_0 - 1))$ | Rendimento quântico de energia dissipada como calor |
| V _T | $(F_t - F_0)/(F_M - F_0)$ | Fluorescência variável relativa |
| ΔV_T | $V_T(\text{controle}) - V_T(\text{tratamento})$ | Diferença cinética da fluorescência variável relativa |